

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky

**Teoretické modelování vlivu elektrického pole přenašečů elektronů
ve fotosystému II na fluorescenční indukci chlorofylu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Barbora Chmelinová

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Dušan Lazár, Ph.D.

Olomouc 2012

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Doc. RNDr. Dušanovi Lazárovi, Ph. D.
za vysoce odborné a zároveň vstřícné vedení práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením pana Doc. RNDr. Dušana Lazára, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce. Souhlasím se zveřejněním této práce v knihovně a na internetových stránkách UP v Olomouci a jejích pracovištích.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

SOUHRN

Chlorofylová fluorescence vypovídá o (ne)schopnosti organismu využít absorbovanou energii světla pro fotochemickou reakci. Nepřímo tak umožňuje sledovat funkční stav složek fotosyntetického transportního řetězce elektronů. Jednou z možností, jak se fluorescence chlorofylu dá měřit, je detekovat její časový průběh při osvětlení vzorku předem adaptovaného na tmu. Takto se měří tzv. fluorescenční indukční jev, jehož počáteční nárůst (fluorescence rise, FLR) je studován v této práci. Charakteristický průběh FLR měřeného za velké intenzity excitačního světla znázorňuje O-K-J-I-P křivka.

Pro studium této křivky je místo jejího experimentálního měření v této práci použito její matematické modelování. Díky modelování je možné odhalit, které parametry mají vliv na průběh FLR. Stávající model Dušana Lazára (2003) je rozšířen o vliv elektrického pole, které vytvářejí elektrony setrvávajících na přenašečích v PSII. Jsou nasimulované tři křivky: u první se předpokládá vliv elektrického pole pouze na akceptorové straně PSII, u druhé je rozšířen model o elektrické pole na donorové straně PSII a u třetí je vliv tohoto elektrického pole od S-stavů z OEC.

V práci bylo jasně ukázáno, že elektrické pole vytvářející se elektrony během jejich transportu v PSII má vliv na tvar křivky FLR.

Summary

Chlorophyll fluorescence informs about an organism's (dis)ability to use absorbed light energy for photochemic reactions. Thus it indirectly enables to observe functional state of photosynthetic electron transport chain components. One of the ways how to measure chlorophyll fluorescence is to detect its time course while a dark-adapted sample is enlightened. This is how the so-called fluorescence induction is measured, whose initial rise (fluorescence rise, FLR) is studied in this work. Typical FLR course measured at high intensity of excited light is represented by the O-K-J-I-P curve.

To investigate the above-mentioned curve, its mathematical modelling is employed instead of its experimental measurements. The modelling can reveal parameters affecting the FLR course. Current model by Dušan Lázar (2003) was extended by the influence of electric field which produces electrons remaining on the electron

transporters in PSII. Three curves are simulated: the first one demonstrates electric field impact only on the acceptor side of PSII, the second one also on the donor side of PSII and the third one contains electric field impact from the S-states of OEC.

This work has clearly showed that electric field created by electrons within their transport in PSII affects the shape of simulated FLR curve.

SEZNAM ZKRATEK

A	Akceptor
D	Donor
DCMU	3-(3',4'-dichlorofenyl)-1, 1-dimethylurea
F_0	minimální fluorescence
F_M	maximální fluorescence
FLR	fluorescenční indukční nárůst
ΔG	Gibbsova (volná) energie
$\Delta G^\#$	Gibbsova (volná) energie aktivovaného komplexu
K	rovnovážná konstanta
k_x	rychlostní konstanta
k_B	Boltzmanova konstanta
LHCII	světlosběrný komplex fotosystému II
OEC	komplex vyvíjející kyslík
P_{680}	dimer chlorofylu <i>a</i> , primární donor e^-
Pheo	feofytin, primární akceptor e^-
PSI	fotosystém I

PSII	fotosystém II
Q _A	chinon, primární stabilní akceptor e ⁻
Q _B	vázaný plastochinon, sekundární akceptor e ⁻
RC	reakční centrum
T	teplota
v	rychlost reakce
Y _Z	tirosin, sekundární donor e ⁻

Obsah

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1 Fotosystém II	3
2.2 Přenos elektronů	4
2.2.1 Komplex štěpící vodu	4
2.2.2 Přenos v RC PSII	4
2.3 Fluorescence	5
2.4 Modelování	6
2.4.1 Rozdělení modelů	6
2.4.2 Modely FLR	7
3. CÍLE PRÁCE	9
4. SOFTWARE PRO SIMULACI	9
5. POPIS MODELU	10
5.1 Kinetika chemických rovnic	10
5.2 Popis modelu Dušana Lazára z roku 2003	11
5.3 Rozšíření modelu o vliv elektrického pole	16
6. VÝSLEDKY A DISKUZE	20
7. ZÁVĚR	25
8. SEZNAM LITERATURY	26

1. ÚVOD

Měření chlorofylové fluorescence patří k velmi častým metodám používaných při studiu fyziologie rostlin a fotosyntézy. Jednou z metod je tzv. fluorescenční indukční jev, popřípadě pouze jeho počáteční nárůst (fluorescence rise, FLR), což je závislost intenzity fluorescence na době osvětlení fotosyntetizujícího vzorku předem adaptovaného na tmu. Charakteristický průběh FLR, měřeného *in vivo* při velké intenzitě excitačního světla, se označuje jako O-K-J-I-P křivka. Jednotlivé vlny se obvykle projeví asi kolem 400 μ s (K), 2 ms (J), 30 ms (I) a 200 - 500 ms (P), přičemž přechodné snížení fluorescence do lokálních minim značených jako D, mohou být pozorovány po krocích K, J i I. Podle stávajících interpretací, křivka FLR odráží převážně funkci fotosystému II (PSII) a proto se snažíme pochopit tuto křivku a tak i funkci PSII jako takového (Lazár 2003).

Pro lepší pochopení těchto experimentálně zjištěných dat se také, a to čím dále tím více, používají i simulace této křivky. Simulace nahrazuje jen části experimentu, neexistuje totiž žádný dokonalý model, který by byl schopen absolutně kopírovat experiment. Modelování nám však ukazuje, jak se mění formy modelu v závislosti na změnách vybraných parametrů. Kvalitativní shoda mezi teoretickým modelem a experimentálně naměřenými daty je dostačujícím a užitečným cílem simulace FLR. FLR je demonstrace komplexního biologického systému a proto je obtížné ji správně nadefinovat a tudíž obdržet absolutní shodu mezi experimentem a simulací (Lazár 2009).

Použitý model (Lazár 2003) popisující reakce v PSII v sobě zahrnuje rovnováhu mezi excitovanými stavy a primární nábojovou separací, dále pak (na akceptorové straně PSII) nábojovou stabilizaci a následný přenos elektronu až na plastochinonový (PQ) pool, jakož i (na donorové straně PSII) donaci elektronu z komplexu, který vyvíjí kyslík, na tyrosin a následně na primární donor elektronů v PSII. Takto formulovaný model je jedním z nepodrobnějších modelů popisující reakce přenosu elektronů v PSII a používaný pro simulaci FLR. Změnou vybraných parametrů modelu (rychlostní konstanty a počáteční podmínky) lze sledovat změny teoretického FLR a porovnat jej s experimentálně naměřenými výsledky. Model, který je popisován v této práci, vychází ze zmíněného komplexního modelu. V této práci byly změněny vybrané parametry modelu a to dopředné rychlostní konstanty reakcí. Tyto změny jsou určovány

elektrickým polem: při přenosu elektronů přes jednotlivé přenašeče dochází k vytváření elektrického pole, když elektron setrvává na daném přenašeči. Toto pole pak působí na ostatní přenášené elektrony. Velikost tohoto pole přímo ovlivňuje právě rychlostní konstanty těchto přenosů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosystém II

Cennou analogií k popisu struktury a funkce PSII zelených řas a vyšších rostlin na molekulární a atomové úrovni je popis fotosyntetického bakteriálního reakčního centra (RC) purpurové bakterie *Rhodospseudomonas viridis*.

PSII u vyšších rostlin se skládá ze světlosběrného komplexu obsahující převážně chlorofyly, RC s molekulou P_{680} napojenou na proteiny a komponenty enzymového komplexu, který vyvíjí kyslík (OEC) oxidací vody. Monomerní PSII komplex (utvářející eliptickou strukturu) má molekulární hmotnost cca 250 kDa a jeho velikost je 2×10 nm s tloušťkou struktury 8 nm. Tento monomer vždy obsahuje po jedné kopii polypeptidů D_1 , D_2 , cytochrom b_{559} , proteiny CP43, CP47, protein o hmotnosti 33 kDa, další polypeptidy s malou hmotností a cca 40 chlorofylu a (Lawlor 2001). Jádru PSII se skládá s dvou polypeptidů D_1/D_2 . D_1 , D_2 (mají různé hmotnosti) obsahují pět membránových segmentů (jejich funkce je rozlišná) a tím pádem jsou v konstrukci heterodimery. Součástí polypeptidu D_1 je tyrosin (označovaný jako Y_z , který odebírá elektrony z OEC), feofytin (Pheo nebo také značen H, nebo H_{D1}) a druhý chinonový akceptor elektronů Q_B . Polypeptid D_2 má k sobě navázaný tyrosin Y_D a váže molekulu prvního chinonového akceptoru elektronů Q_A . Oba tyto polypeptidy dohromady váží P_{680} , pár chlorofylu a (chl a). D_1 je produktem *psbA* genu a D_2 *psbD*. D_1/D_2 heterodimer se vyskytuje na jednom konci elipsy jádra PSII a proteiny CP43 a CP47 na jejím druhém konci. Proteiny CP47 a CP43 slouží k záchytu a přenosu excitační energie k RC, jsou velmi hydrofobní s šesti transmembránovými helixy s amino- a karboxylovými skupinami orientovanými do stromatu. Oba proteiny mají velké smyčky mezi 5 a 6 helixem postavené k lumenu, které dává CP47 do kontaktu s 33 kDa proteinem OEC a pravděpodobně tak utvářejí místo pro manganový klastr. CP47 obsahuje 20-22 chl a a 2-4 β -karoteny, CP43 má 20 chl a 5 β -karotenů. Monomery jádra PSII se díky CP43 antiparalelně navazují a vytvářejí dimery PSII. Rozměry dimeru PSII jsou $20 \times 12 \times 8$ nm a molekulární hmotnost je okolo 450 kDa (Lawlor 2001). Dimer vždy obsahuje stejné komponenty ve stejných poměrech jako je u

monomeru. D_1/D_2 v kontaktu s CP43 vytváří anténu, která se nachází na každém pólu membrány.

V RC se vyskytuje také cytochrom b_{559} , β -cytochrom (pravděpodobně slouží k ochraně RC při fotoinhibici) a světlosběrný komplex LHCII sloužící jako sběrač excitační energie pro PSII, která je pak použita pro uvolnění elektronu z P_{680} .

2.2. Přenos elektronů v PSII

2.2.1 Komplex štěpící vodu

Enzymový komplex štěpící vodu za uvolnění kyslíku (water splitting komplex (WSC)), nebo také komplex vyvíjející kyslík (oxygen evolving komplex (OEC)), je umístěný v tylakoidní membráně na lumenové straně. Uprostřed OEC je klastr 4 manganů, který při rozkladu vody postupně prochází jednotlivými redoxními stavy – S-stavy.

Oxidovaná forma P_{680} , to je P_{680}^+ , sledem reakcí (které nejsou zcela objasněny) oxiduje vodu za přítomnosti Mn^{2+} (kofaktor nutný pro průběh daných reakcí), což vede k uvolnění O_2 z vody. Elektrony, které jsou odebrané vodě během její oxidace, redukují právě P_{680} a to přes tyrosin Y_z .

2.2.2. Přenos v RC PSII

PSII, jak už bylo řečeno výše, obsahuje molekuly chlorofylu a i b , které jsou vázané na proteinové nosiče. Absorpční maximum PSII je v oblasti 680-670 nm (Kaplanová a kol. 1987). RC přijme excitační energii dodanou z LHCII, čímž se vytvoří excitovaný stav P_{680} (P_{680}^*). P_{680} absorbuje excitační energii, pouze pokud je předtím v redukovaném stavu. Pokud je P_{680} oxidovaný, excitační energii nevyužije a přesouvá ji do jiných RC s redukovaným P_{680} (podle některých autorů, P_{680}^+ může dokonce excitační energii zhaset). Naexcitovaný P_{680} vede k uvolnění elektronu z P_{680} . Primárním akceptorem elektronů z P_{680} je Pheo (v PSII se vyskytuje ještě jeden feofitin H_{D2} , který se však neúčastní elektronového transportu). Tento elektronový přenos z P_{680} do Pheo se nazývá nábojová separace, zpětný přenos je pak nábojová rekombinace.

Pheo předává elektron na Q_A v procesu nazývaném nábojová stabilizace. Za pomoci molekuly kationtu železa (Fe^{2+}) je elektron přenesen od Q_A na Q_B , který je v oxidovaném stavu. Pokud je Q_B v redukované formě (Q_B^-), může přijmout i druhý elektron za vzniku Q_B^{2-} , který poté přijme 2 protony ze stromatu a vznikne elektricky neutrální forma Q_BH_2 . Tato neutrální forma je pouze slabě vázaná na PSII a snadno se uvolňuje do tylakoidní membrány, čímž se stává redukovanou formou PQ poolu. Na volné místo v PSII vzniklého po vyvázání Q_BH_2 se naváže oxidovaná molekula PQ z poolu, čímž v PSII vznikne oxidované Q_B . Redukovaný PQ pool se oxiduje předáním elektronů na komplex cytochrom b_6/f (Vodrážka 2002).

2.3. Fluorescence

Protože fluorescence chlorofylu je konkurenční proces k využití excitační energie na fotochemickou nábojovou separaci, je fluorescence indikátor (ne)schopnosti organismu využít absorbovanou energii pro fotochemickou reakci, tedy nepřímo umožňuje sledovat funkční stav složek fotosyntetického transportního řetězce.

Jednou z možností měření fluorescence chlorofylu je detekce časového průběhu fluorescence při osvětlení vzorku po jeho předchozí adaptaci na tmu. V tomto případě se měří tzv. fluorescenční indukční jev. Fluorescence během indukčního jevu nejdříve rychle roste (fluorescence rise (FLR)), a poté pomalu klesá. Charakteristický průběh FLR měřeného za velké intenzity excitačního světla znázorňuje O-J-I-P křivka. Signál FLR vzniká za fyziologických podmínek hlavně z PSII. Podíl fluorescence vzniklé ve fotosystému I (PSI) z celého signálu FLR za pokojové teploty je maximálně okolo 20 %, a tento signál je konstantní (Lazár 2003).

Podle definice minimální fluorescence F_0 je fluorescence, kdy všechna RC PSII jsou otevřená, tj. v rámci nábojové separace, když P_{680} je redukované a Pheo je oxidovaný. Podle tohoto konceptu, nenulová minimální fluorescence F_0 je potom ta fluorescence, která je emitovaná poté, co je nastolena rovnováha excitací mezi všemi světlosběrnými pigmenty a P_{680} a před nábojovou separací. Na druhou stranu, maximální fluorescence F_M (nebo také F_P) nastává, pokud je RC PSII zavřené, tj. v rámci nábojové separace, v případě kdy k ní nemůže dojít, čili když P_{680} je oxidované, nebo Pheo je redukovaný nebo obojí současně. Pojmy otevřené a zavřené RC PSII jsou

však velmi často, avšak ve více aproximativním přístupu, také vysvětlovány pomocí redoxního stavu Q_A : je-li Q_A oxidované, je RC PSII otevřené a je-li redukováno Q_A , je RC PSII zavřené (viz dále). Existují však i jiné definice pro pojmy otevřené a zavřené RC PSII (Lazár 2003).

Literatura se shoduje, že první krok po F_0 , za všech intenzit světla, odráží akumulaci redukováného Q_A kontrolovaného intenzitou světla: tento počáteční nárůst fluorescence se nazývá fotochemická fáze. Na křivce FLR tato fáze odpovídá nárůstu fluorescence z F_0 (O) do vlny J. Po fotochemické fázi nastává tzv. termální fáze, která již závisí na teplotě měření. Jde o J-I-P část FLR měřené při vysokých intenzitách světla. Předpokládá se, že ta odráží nejen akumulaci redukováného Q_A , ale také akumulaci přenašečů elektronů za Q_A a to hlavně Q_B (Lazár 2003).

Dvoufázovost termální fáze, růst J-I a následně I-P, v FLR měřené za vysoké intenzity světla zřejmě odráží spolu s akumulací různých kombinací redukováného Q_A a Q_B i heterogenitu PSII. Přítomnost vlny I ve FLR může také odrážet redoxní reakce vznikající za PSII, konkrétně v donoru elektronu v PSI – P_{700} a jeho okolí. Toto tvrzení vychází z faktu, že maximum oxidace P_{700} je dosaženo právě v pozici vlny I ve FLR a poté začíná být P_{700}^+ redukováný elektrony donovanými z PSII. Takže v křivce FLR, v krocích J-I-P, je pravděpodobně zobrazená účast všech elektronových přenašečů v rámci tylakoidní membrány (Lazár 2003).

2.4 Modelování

2.4.1 Rozdělení modelů

Neexistuje žádný dokonalý model. Model vždy pouze aproximuje realitu. Simulace nám ukazuje, jak se stavové proměnné (= modelové formy) mění v závislosti na změnách parametrů modelu a to může pomoci experimentátorovi určit, které parametry jsou důležité a které ne (Lazár 2009). Postačujícím cílem modelování biologických systému je kvalitativní shoda mezi teorií a experimentem.

Modelovat můžeme dvěma způsoby:

a) Fitování

Pomocí matematických metod se hledají hodnoty parametru modelu k získání co nejlepší shody mezi experimentálními a modelovanými křivkami (Lazár 2009). Matematická rutina pro co nejlepší shodu automaticky fituje vybrané parametry modelu. Problémem tohoto modelování je skutečnost, že je více teoretických řešení pro nalezení „nejlepší“ shody teorie s experimentem. Změna jednoho parametru modelu může být nahrazena změnou v parametru jiném, aniž by se ztratila „shoda“ mezi teorií a experimentem, takže správnost takto získaných hodnot parametrů modelu je zpochybněna (Lazár 2009).

b) Simulace

Simulace, na rozdíl od fitování, používá předdefinované hodnoty parametrů modelu na základě literatury. Simulovaná křivka se pak porovnává s daty získanými experimentálně při stejných počátečních podmínkách. Nelze dosáhnout absolutní shody mezi simulací a experimentem. Výhodou simulace je možnost nalezení parametrů modelu ovlivňující vybranou vlastnost simulované křivky (Lazár 2009).

2.4.1. Modely FLR

Většina modelů FLR popisuje reakce přenosu elektronů v PSII a PQ poolu, ale fluorescenční měření na intaktních systémech ukazuje jasný efekt i přenosu elektronů na/v PSI na FLR (Lazár 2009). Někteří autoři (např. Schreiber) korelovali nárůst fluorescence během I-P fáze FLR s poklesem absorpčního signálu měřeného při 820 nm představující opakovanou redukci oxidovaného P_{700} a oxidovaného plastocyaninu. I-P fáze by pak podle těchto autorů mohla představovat variabilní fluorescenci pocházející z PSI. Obecně se ale fluorescenční signál vznikající v PSI považuje za nevariabilní, takže má fluorescence z PSI v čase neměnnou konstantní úroveň (Lazár 2009).

Na základě poznatků byly vytvořeny tři modely, které popisují určité části PSII:

1. Model reverzibilního radikálového páru (RRP, Breton 1983) – popisuje užití energie vedoucí k primární fotochemii (oddělení nábojů a jejich rekombinaci a stabilizaci) v „otevřeném“ (Q_A) a „zavřeném“ (Q_A^-) PSII (Lazár 2003). Popisuje tedy přenos elektronů P_{680} přes Pheo na Q_A . Původní RRP model byl navržený jen pro popis poklesu fluorescence v pikosekundové a nanosekundové oblasti po tvorbě excitovaných stavů pomocí velmi krátkých laserových pulsů a tím pádem neobsahoval o mnoho pomalejší redukci P_{680}^+ donorovou stranou PSII (Lazár 2009). Aby tento model mohl být využitý k modelování FLR, musel být rozšířen o tyto pomalejší redukční procesy.

2. Kokův model (Kok 1970) – popisuje funkci donorové strany PSII, tj. donaci 4 elektronů z OEC při cyklické a postupné oxidaci jeho manganového klastru přes stavy značené jako S_0 , S_1 , S_2 a S_3 zpět na S_0 , kde dolní index značí oxidační stav manganového klastru OEC, tj. 0, +1, +2, +3. K vývoji kyslíku dochází při přechodu z S_3 na S_0 .

3. Model dvouelektronové brány (two-electron gate (TEG), Bouges-Bocquet 1973) – popisuje funkci akceptorové strany PSII, tedy přenos elektronů z Q_A na Q_B a skutečnost, že Q_B je dvouelektrový přenašeč na rozdíl od Q_A . Tento model se hlavně využívá při modelování křivky FLR měřené v tylakoidních membránách při osvětlení nízkou intenzitou excitovaného světla charakterizované kroky O-I-P. Rozšířená verze tohoto modelu se použila k simulaci kroků O-J-I-P (Lazár 2003).

Dohromady tyto modely nám dávají téměř celkový teoretický popis přenosu elektronů v PSII.

FLR bývá často v literatuře simulován na základě vylepšeného TEG modelu (např. Lazár a kol. 1997). RRP model byl použit pro simulaci měření FLR za přítomnosti 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurace (DCMU – inhibitor přenosu elektronů z Q_A do Q_B ,) (Lazár a Pospíšil 1999). Stirbetová a Strasser v roce 2001 fitovali parametry TEG modelu na experimentální O-J-I-P FLR, ale hodnoty některých rychlostních konstant modelu takto získané byly daleko od zdokumentovaných a přijatých hodnot. I když autoři argumentovali, že hodnoty z literatury byly získány za jiných podmínek a jinými metodami měření, je rozdíl v hodnotě dané rychlostní konstanty o několik řádu podezřelý (Lazár 1999).

V roce 2003 Lazár publikoval nový model pro simulaci FLR, kde model vznikl na základě spojení všech tří výše zmíněných modelů a doplněním o některé chybějící kroky (např. přenos elektronů spojený s Y_Z). Takto nově získaný model popisuje téměř kompletně přenos elektronu v PSII. Je zaměřen na změnu tvaru křivky FLR způsobené změnami v parametrech modelu zdokumentovaného v literatuře: takto můžeme vidět vliv změn reakcí v PSII na tvar křivky FLR (Lazár 2003).

3. CÍLE PRÁCE

Stávající model Dušana Lazára z roku 2003 publikovaného v časopise *Journal of Theoretical Biology* rozšířit o vliv elektrického pole na hodnoty rychlostních konstant přenosu elektronů, které vytvářejí elektrony setrvávající na přenašečích v elektronovém transportu v PSII a sledovat vliv tohoto elektrického pole na tvar simulovaného FLR.

4. SOFTWARE PRO SIMULACI

Průběh fluorescenčního signálu FLR je simulovaný pomocí programu Gepasi verze 3.21 (P. Mendes, The University of Wales, Aberystwyth, U.K.), který byl navržen pro simulaci chemických a biochemických kinetik. Gepasi používá pro integraci soustavy řádných diferenciálních rovnic (Ordinary Differential Equation (ODE)) proceduru LSODA, což je jedna z verzí procedury LSODE (Livermore Solver of Ordinary Differential Equations). LSODA je sofistikovaný algoritmus, který měří tuhost soustavy ODE a změni integrační metodu dynamicky podle míry tuhosti. Adamsova metoda s proměnným krokem a proměnným řádem až do 12. řádu se používá pro netuhé oblasti. Pro tuhé oblasti se používá Gearova nebo BDF metoda s proměnným krokem a s proměnným řádem až do 5. řádu. (Lazár 2003).

5. POPIS MODELU

5.1. Kinetika chemických rovnic

Biochemické reakce jsou ve většině případů oboustranné. Takže se mohou objevovat v obou směrech, což pak vede ke kladným a záporným hodnotám rychlosti reakce V . Aktuální směr reakce závisí na současných koncentracích reaktantů.

Pokud není uvedeno jinak, většina reakcí v schématu 1 je popsána pomocí srážkové teorie, to znamená, že pro vratnou (reverzibilní) monomolekulární reakci typu $A \rightleftharpoons B$ (30 reakcí v schématu 1A a 1 reakce v schématu 1B) s dopřednou a zpětnou rychlostní konstantou k_1 a k_{-1} . celková rychlost reakce je $V = v_1 - v_{-1}$, kde v_1 a v_{-1} jsou rychlosti reakce vpřed a vzad, tedy

$$\begin{aligned}v_1(t) &= k_1[A](t), \\v_{-1}(t) &= k_{-1}[B](t).\end{aligned}\tag{1}$$

Jestliže je reakce nevratná (ireverzibilní) (18 reakcí v schématu 1A a 2 reakce v schématu 2C) pak $V = v_1$. V případě bimolekulárních vratných reakcí typu $A + C \rightleftharpoons B + D$ (1 reakce v schématu 1B a 1 reakce v schématu 1C) je celková rychlost reakce V daná vztahem

$$V = k_1[A](t)[C](t) - k_{-1}[B](t)[D](t),\tag{2}$$

k_1 a k_{-1} jsou rychlostní konstanty dopředné a zpětné reakce, $[A](t)$, $[B](t)$, $[C](t)$, $[D](t)$, jsou koncentrace reaktantů v čase t . Pokud je bimolekulární reakce nevratná pak platí

$$V = k_1[A](t)[C](t).\tag{3}$$

Pro ilustraci koncentrace A a B v čase t u monomolekulární vratné reakce se dají vyjádřit jako

$$[A](t) = [A]_0 e^{-k_1 t} + [B]_0 (1 - e^{-k_1 t})$$

a (4)

$$[B](t) = [A]_0(1 - e^{-k_1(t)}) + [B]_0 e^{-k_2(t)},$$

kde $[A]_0$ a $[B]_0$ jsou počáteční koncentrace reaktantu a produktu. Analytický výraz pro koncentraci jakékoliv formy v modelu je velmi složitý, protože koncentrace každé modelové formy je ovlivněna koncentrací jiných forem v modelu se objevujících. V modelu Lazára (2003) je 44 forem. Program Gepasi používaný pro simulaci, počítá časové průběhy modelových forem numericky. Tento software byl navržen pro simulaci chemických kinetik za použití diferenciálních rovnic popisujících časové derivace jednotlivých forem v modelu.

5.2. Popis modelu Dušana Lazára z roku 2003

Výše byly zmíněny dva teoretické modely použité pro matematické simulace FLR. V prvním případě (Lazár a kol. 1997) byla křivka O-J-I-P simulována pomocí TEG modelu. Fluorescenční signál během FLR je pak v tomto případě dán množstvím zredukovaného Q_A v tomto modelu. V druhém případě (Lazár a Pospíšil 1999) byla FLR měřena na vzorcích ošetřených s DCMU, čímž byly realizované podmínky popsané v RRP modelu. Fluorescenční signál během FLR byl v tomto modelu vyjádřen jako zářivá deaktivace excitovaných stavů. Aby se lépe popsaly změny v PSII za přítomnosti DCMU a vysokých teplot, byl RRP model rozšířen popisem funkce donorové strany v PSII. V prvním případě byl pro modelování FLR použitý model, který výrazně zjednodušuje skutečnou situaci, v druhém případě byl použitý více detailní model, ale popisoval případ přenosu elektronu pouze po Q_A (způsobenou přítomností DCMU). Model Lazára (2003) zahrnuje v sobě oba tyto modely a funkčně je rozšiřuje.

Model Lazára je vytvořen na základě pouze jednoho předpokladu, a to, že FLR je vlastnost pouze PSII systému, takže popisuje pouze kroky přenosu elektronů vyskytujících se v PSII. Tedy se zde nevěnuje pozornost dalším reakcím popisujících přenos elektronů za PQ poolem. Schéma reakcí modelu je uvedeno na schématu 1.

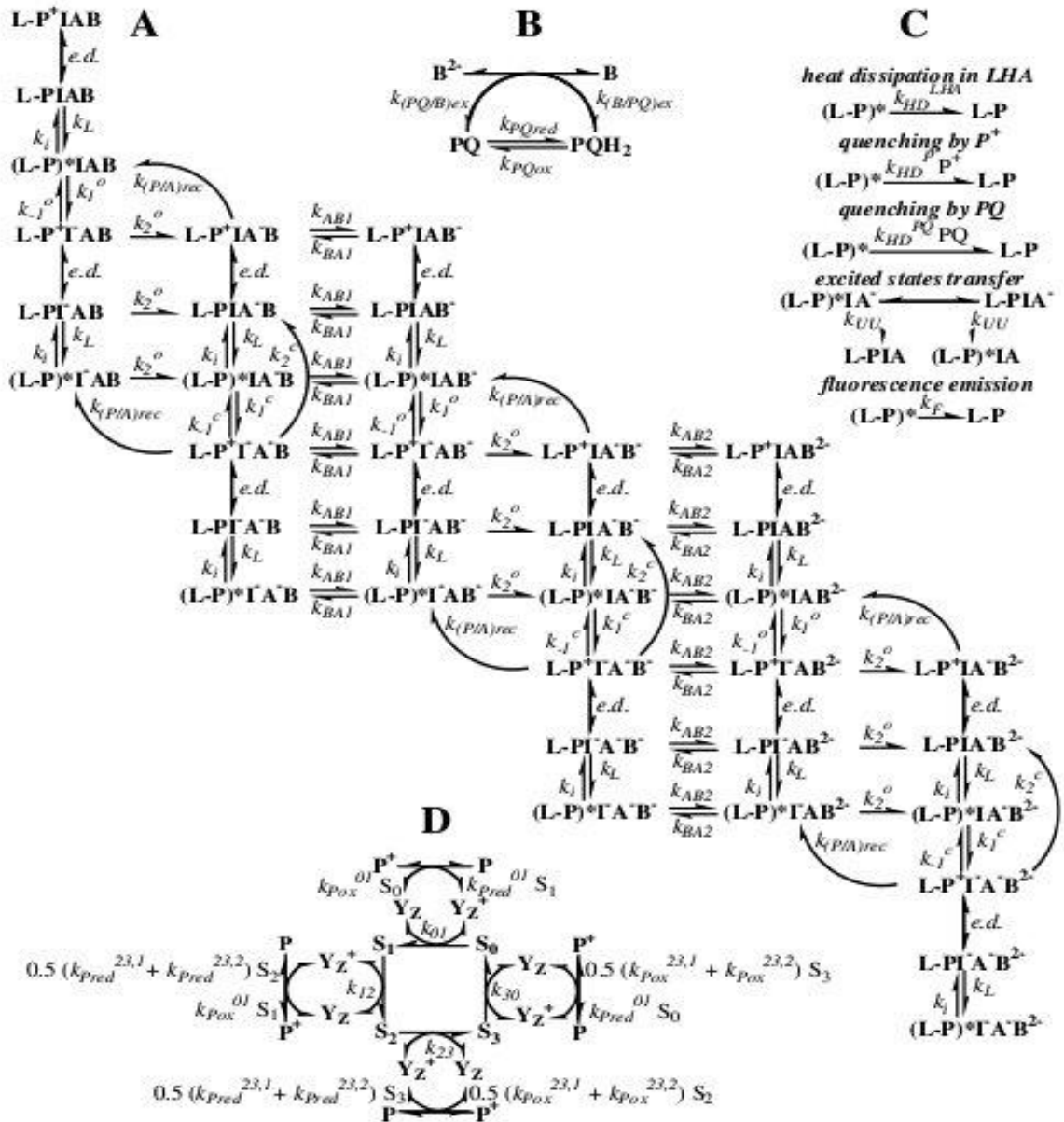


Schéma 1.: Schéma modelu přenosu elektronů v PSII. Schéma je převzato z článku Lazár (2003). Model je rozdělen do čtyř částí. Část A popisuje schéma hlavních reakcí, část B popisuje reakce související s PQ polem, část C popisuje reakce související s excitovanými stavy, kromě nábojové separace a část D popisuje reakce odehrávající se na donorové straně PSII. Reakce zobrazené v částech B – D pobíhají pokaždé, když se vytvoří redoxní stav dané přenašečem, neohledně na redoxní stavy dalších přenašečů celkové modelové formy v reakci. Význam zkratk: L – všechny světloběrné pigmenty v LHA a RCII, P – P₆₈₀ (primární elektronový donor v PSII), I – Pheo (feofitin, primární elektronový akceptor), A – Q_A (první chinonový akceptor), B – Q_B (druhý chinonový akceptor), PQ – oxidovaný plastochinon v PQ

poolu, PQH₂ – redukovaný a protonovaný plastochinon v PQ poolu, Y_Z – tyrosin 161 (sekundární donor v PSII), S_i(i = 0, 1, 2, 3) – S-stavy OEC, hvězdička (*) ukazuje excitované stavy. Významy rychlostních konstant jsou uvedeny v dále textu, jejich hodnoty použité pro simulaci pak v tabulce 1. Relativní počáteční množství modelových forem: [(L-P)IB]₀ = 1 (za tmy není vytvořena žádná excitace, P₆₈₀ je redukované a Pheo, Q_A a Q_B jsou oxidované), [Y_Z]₀=1 (redukovaný za tmy), [S₀]₀ = 0,25 a [S₁]₀ = 0,75 (25% a 75% OEC je za tmy ve stavech S₀ a S₁), [PQ]₀ = 7 (tj. 7 PQ molekul v PQ poolu a všechny jsou za tmy oxidované). Relativní počáteční množství ostatních modelových forem jsou 0.

Vlastnosti tohoto modelu jsou:

- (i) tvorba excitovaných stavů je popsána rychlostní konstantou k_L , která je úměrná intenzitě excitačního světla.
- (ii) deaktivace excitovaných stavů ss děje pomocí nábojové separace mezi P₆₈₀ a Pheo (jde o reakce s rychlostními konstantami k_I^o a k_I^c uvedené ve schématu 1A), nezářivé deaktivace ve světloměrné anténě (LHA, k_{HD}^{LHA}), zhášení excitovaných stavů pomocí P₆₈₀⁺ (k_{HD}^P), zhášení excitovaných stavů pomocí oxidovaného plastochinonu z PQ pool (k_{HD}^{PQ}), pomocí přenosu excitační energie mezi uzavřeným a otevřeným RCII (k_{UU} , čtvrtá reakce v schématu 1C) a přes fluorescenci (k_F , dolní reakce v schématu 1C).
- (iii) fluorescenční signál během FLR je definován jako zářivá deaktivace excitovaných stavů užitím rychlostní konstanty fluorescence k_F .
- (iv) v každém redoxním stavu Q_B (Q_B, Q_B⁻, Q_B²⁻) primární fotochemie (oddělení náboje, rekombinace a stabilizace) je popsána v RRP modelu pro oba redoxní stavy Q_A, pro oxidované, tak i pro redukované (k_1^o , k_{-1}^o , k_2^o , k_1^c , k_{-1}^c , k_2^c , schéma 1A).
- (v) když je Q_A v redukované formě, elektron je přenesen na Q_B ve smyslu TEG modelu, to znamená, že elektron je přenesen z Q_A⁻ na Q_B nebo na Q_B⁻ s různými rychlostními konstantami (k_{AB1} , k_{BA1} , k_{AB2} , k_{BA2} , schéma 1A).
- (vi) když je Q_B dvojnásobně redukované (implicitně se předpokládá okamžitá protonace), je vyměněný za molekulu PQ z PQ poolu ($k_{(PQ/B)ex}$, $k_{(B/PQ)ex}$, schéma 1B).
- (vii) když je P₆₈₀ oxidovaný oddělením náboje, je redukovaný elektronem z Y_Z (k_{Pred} , k_{Pox} , schéma 1D, jehož reakce nastanou vždy, když je ve schématu 1A u reakce uvedeno „e.d.“ (electron donation).
- (viii) když je Y_Z oxidovaný, redukce Y_Z⁺ je popsána Kokovým modelem pro funkci OEC (k_{01} , k_{12} , k_{23} , k_{30} , schéma 1D).
- (ix) rekombinace nábojů mezi P₆₈₀⁺ a Q_A⁻ ($k_{(P/A)rec}$, schéma 1A).

Obecně lze říci, že v modelu Lazara (2003) se uvažují pouze ty reakce, které mají časovou konstantu menší než 1 sekunda, což je přibližně doba, po kterou se detekuje FLR. Reakce a jejich rychlostní konstanty uvedené v tomto modelu jsou obecně přijaté v literatuře (Lazár 2003).

V PSII se ale realizují i reakce a využívají přenašeče elektronů, které nejsou v modelu zahrnuty, jsou to například tyto přenašeče či reakce:

- (i) Y_D (tyrosin 160, nacházející se v proteinu D_2 v PSII) – ten není zapojen do přenosu elektronů přes PSII.
- (ii) Fe^{2+} nacházející se mezi Q_A a Q_B – jeho účinek na kinetiku přenosu elektronů není v literatuře dosud popsán.
- (iii) *cytochrom* b_{559} – ten se na přenosu elektronů v PSII podílí, ale jen za stresových podmínek (např. při fotoinhibici), ale v tomto případě je časová konstanta této reakce je větší než 1 s.
- (iv) kroky spojené s protonací redukovaného Q_B a záměny Q_B^{2-} s PQ z PQ poolu – ty se v literatuře neshodují.
- (v) nábojová rekombinace mezi kladnými náboji uloženými na donorové straně PSII a zápornými náboji uloženými na akceptorové straně PSII – jejich časové konstanty jsou větší než 1s.
- (vi) zhášení excitovaných stavů v RC pomocí jeho dvou β karotenů – za fyziologických podmínek (nestresové podmínky) mají tyto reakce nízký výtěžek.
- (vii) anihilace excitovaných stavů – je zde nutná velmi vysoká intenzita světla (například laserové impulsy) z důvodů, aby byla dostatečná hustota excitovaných stavů, to ale není případ měření FLR (Lazár 2003).

Relativní počáteční množství dané modelové formy v modelu a hodnoty rychlostních konstant jednotlivých reakcí jsou vstupními parametry pro jednotlivé simulace. Relativní počáteční množství konkrétní modelové formy jsou uvedeny v popisku pod schématem 1. Hodnoty rychlostních konstant jsou známé z literatury a jsou uvedené v tabulce 1.

Tabulka č.1.: Hodnoty rychlostních konstant užívané při simulaci FLR a jejich hodnoty v literatuře. Převzato z Lazár (2003)

rychlostní konstanta	použité hodnoty (s ⁻¹)	hodnoty z literatury (s ⁻¹)
k_L	4 000	4 000-5 500
k_F	$6,7 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$
k_{HD}^{LHA}	5×10^8	$3 - 10 \times 10^8$
k_{HD}^P	1×10^9	1×10^9
k_{HD}^{PQ}	$5,6 \times 10^9$	$5,6 \times 10^9$
k_{UU}	1×10^9	$1 - 6 \times 10^9$
k_1^0	3×10^9	$1,9 - 9,3 \times 10^9$
k_{-1}^0	3×10^8	$3 - 20 \times 10^8$
k_2^0	$2,3 \times 10^9$	$2 - 2,3 \times 10^9$
k_1^C	$4,8 \times 10^8$	$4,8 - 15 \times 10^8$
k_{-1}^C	$3,4 \times 10^8$	$3,4 - 30 \times 10^8$
k_2^C	1×10^9	$3 - 10 \times 10^8$
k_{Pred}^{01}	5×10^7	5×10^7
$k_{Pred}^{23,1}$	2×10^7	$2 - 2,5 \times 10^7$
$k_{Pred}^{23,2}$	$3,6 \times 10^6$	$3,5 - 3,8 \times 10^6$
k_{Pox}^{01}	$1,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
$k_{Pox}^{23,1}$	$6,7 \times 10^6$	$6,7 - 8,3 \times 10^6$
$k_{Pox}^{23,2}$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 - 1,3 \times 10^6$
k_{01}	20 000	10 000 - 33 300
k_{12}	10 000	7 150 - 25 000
k_{23}	3 330	1 660 - 16 600
k_{30}	1 000	660 - 1 330
k_{AB1}	3 500	2 500 - 5 000
k_{BA1}	175	125 - 250
k_{AB2}	1 750	1 250 - 3 330
k_{BA2}	35	25 - 67
$k_{(B/PQ)ex}$	250	70 - 345
$k_{(PQ/B)ex}$	250	70 - 345
k_{Pqox}	10	10 - 17
k_{Pqred}	10	10 - 17
$k_{(P/A)rec}$	10 000	5 000 - 10 000

5.3. Rozšíření modelu o vliv elektrického pole

Základem modelů pro fluorescenční indukci chlorofylu je popis přenosu elektronů během primárních fotochemických reakcí v PSII. Za účelem zavedení efektu elektrického pole na kinetiku reakce je nutná znalost některých pojmů dávajících do souvislosti reakční kinetiku a termodynamiku. Toto je uvedeno v následujícím textu.

Pro popis dějů v chemických reakcích se nejčastěji využívá tzv. Gibbsova volná energie (ΔG), to je pro případy, kdy reakce probíhá za konstantní teploty a konstantního tlaku, což je ve většině reakcí. Gibbsova volná energie (nebo taky jenom Gibbsova energie) je vhodná pro posouzení termodynamické rovnováhy. Reakce (její spontánnost a její rovnováha) je dána rozdílem mezi Gibbovými energiemi produktu a substrátu (viz obrázek 1). Tento rozdíl Gibbových energií $\Delta\Delta G$ je přímo úměrný logaritmu rovnovážné konstanty K dané reakce

$$\Delta\Delta G = -k_B T \ln K, \quad (5)$$

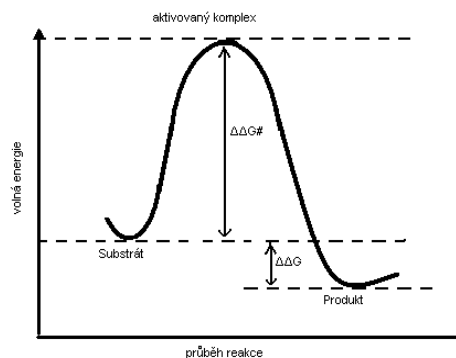
kde k_B je Boltzmanova konstanta [JK^{-1}], T je teplota v Kelvinech (Klipp a kol. 2008). Rovnice (5) je vztažena na 1 molekulu, ale někdy se uvádí i ve vztahu na 1 mol látky, pak je k_B nahrazeno univerzální plynovou konstantou R . Na druhé straně, z teorie přechodného stavu, též nazývané jako teorie aktivovaného komplexu, pak plyne, že hodnota Gibbovy energie přechodného stavu (= aktivovaného komplexu, ΔG^\ddagger) vzhledem ke Gibbovým energiím substrátu a produktu určuje kinetiku probíhající reakce. Platí, že rozdíl mezi Gibbovou energií substrátu a Gibbovou energií aktivovaného komplexu, určuje rychlostní konstantu k_1 dopředné reakce (viz obr. 1)

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -k_B T \ln k_1, \quad (6)$$

pak

$$k_1 = e^{-\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{k_B T}}, \quad (7)$$

zatímco $\Delta\Delta G^\ddagger + \Delta\Delta G$ určuje rychlostní konstantu k_{-1} zpětné reakce (Klipp a kol 2008).



Obrázek 1. Změna Gibbsovy volné energie během průběhu reakce. V lokálních minimech se nachází substrát a produkt, v lokálním maximu je umístěný aktivní komplex (Klipp a kol. 2008).

Ve všech stávajících modelech (tedy i v modelu od Lazára z roku 2003) se však neuvažuje vliv elektrického pole, které kolem sebe vytváří elektron setrvávající na daném přenašeči. Toto elektrostatické pole pak působí na ostatní přenášené elektrony. Velikost intenzity elektrického pole okolo bodového náboje se definuje vztahem:

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{Q}{r^2}, \quad (8)$$

kde ϵ je permitivita prostředí okolo elektrického náboje, Q je velikost bodového náboje, r je vzdálenost od bodového náboje.

V závislosti na velikosti intenzity těchto polí se neustále mění elektrostatická potenciální energie. Tato energie souvisí s vykonanou prací při přenosu elektronu z jednoho přenašeče k druhému. Práce, která se vykonává přenosem elektronu po dráze proti elektrickým silám, je rovna záporně vzatému integrálu po této dráze ze složky elektrické síly ve směru pohybu:

$$W = - \int_{s_1}^{s_2} F ds, \quad (9)$$

kde F je elektrická (Coulombova) síla působící na náboj, ds je diferenciál posunutí po dráze (Feynman a kol. 2001).

Z chemického hlediska se tak mění v závislosti na potenciální energii elektrického pole elektronů na daném přenašeči změna Gibbsovy energie a ve vztahu k tomuto se pak mění rychlost přenosů elektronů, čili rychlostní konstanty těchto fotochemických reakcí. Při uvažování reverzibilního přenosu elektronu z donoru D na akceptor A, budeme pro jednoduchost uvažovat pouze lokální ovlivnění náboje v dané reakci. Jiné náboje v PSII uvažovat nebudeme, a to z důvodu, že vliv elektrického pole na přenos elektronů je závislý na vzdálenosti. Z toho vyplývá, že vliv nábojů na jiných akceptorech na sledovanou reakci je zanedbatelně malý. Dále pak se předpokládá, že v každém čase se přenáší jednotkový náboj elektronu a rychlost přenosu tohoto elektronu je ovlivněna nábojem na akceptoru elektronu A, kde se elektron přenáší. Čili na počátku reakce, v čase $t = 0$, je elektron ještě na donoru D a žádný elektron není na akceptoru A, v čase t , se už nějaké množství elektronu přeneslo na akceptor A a tím vzniklé elektrické pole začne ovlivňovat následný přenos elektronu na tento akceptor. Jinými slovy, elektrické pole, které již zredukovaný akceptor A vytváří, začne odpuzovat elektron následně přenášený z donoru na akceptor A. Tím akceptor A modifikuje rychlost svého vlastního vzniku. Toto elektrické působení je dynamický jev, který se v čase kontinuálně mění. Z toho vyplývá, že $\Delta\Delta G$ je časově proměnné na množství zredukovaného akceptoru A náboje Q

$$\Delta\Delta G^{Q(t)} = \frac{qQA(t)}{4\pi\epsilon_0 r} \quad , \quad (10)$$

kde q je jednotkový náboj přenášeného elektronu, Q je jednotkový náboj na akceptoru, $A(t)$ je relativní časově proměnné množství již zredukovaného akceptoru a r je vzdálenost donoru D od akceptoru A, což v modelu je vzdálenost jednotlivých přenašečů v PSII v dané reakci (uvedené v tabulce 2), hodnota ϵ_0 je relativní permitivita ($55,25 \cdot 10^{-4} \text{ eV \AA}^{-1}$). Takto nadefinované působení elektrického pole na změnu Gibbsovy energie chápáno jako první přiblížení skutečnosti z důvodu jednoduchosti výpočtů.

Tabulka č. 2.: vzdálenosti přenašečů v PSII v Ångstömehch

Přenašeče	vzdálenost r [Å]
OEC - Y _Z	5,4
Y _Z - P ₆₈₀	12,4
P ₆₈₀ - Pheo	18
Pheo - Q _A	12
Q _A - Q _B	18,7

Hodnoty jsou průměrné hodnoty z literatury (Zouni a kol. 2001, Ferreira a kol. 2004). Vzdálenosti byly získané rentgenovou strukturální analýzou, nepřesnost v určení byla ± 1 Å.

Protože je v čase proměnná $\Delta\Delta G$, podle výše uvedené rovnice (6) jsou časově závislé i rychlostní konstanty pro přenos elektronu z D na A. Jelikož je ve schématu více dopředných reakcí než zpětných, pro jednoduchost v modelu budeme uvažovat, že vliv elektrostatického pole přenášeným nábojem působí pouze na dopředné reakce. Takže se bude ovlivňovat rychlostní konstanta dopředné reakce $k_1^{Q(t)}$. Pro ni pak po úpravě rovnice (6) platí vztah:

$$k_1^{Q(t)} = k_1^0 e^{-\frac{\Delta G Q(t)}{k_B T}}, \quad (11)$$

kde Boltzmanova konstanta je zde v jednotce eV K⁻¹ ($8,617 \cdot 10^{-5}$ eV K⁻¹).

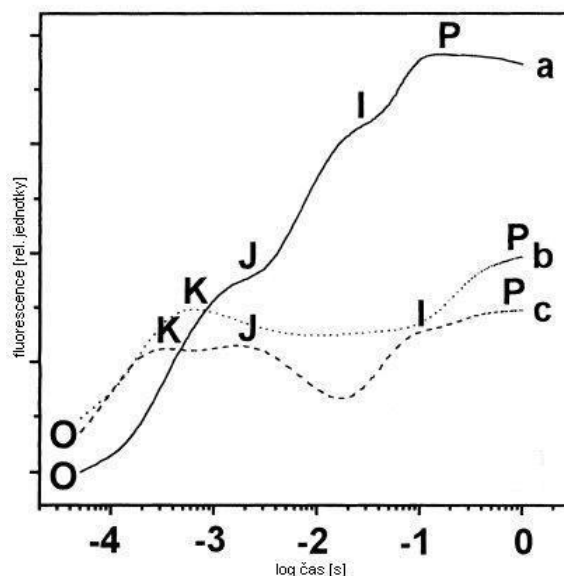
Po dosazení rovnice (10) do rovnice (11) dostaneme:

$$k_1^{Q(t)} = k_1^0 e^{-\frac{qQA(t)k_B T}{4\pi\epsilon}}. \quad (12)$$

Změna rychlostní konstanty dopředné reakce popsaná rovnicí (12) je použita ve všech reakcích modelu, kde se předpokládá vliv elektrického pole na rychlostní konstantu dopředného přenosu elektronu.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

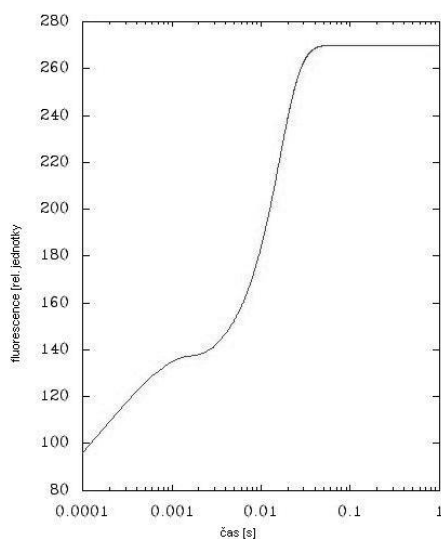
Za účelem možnosti porovnání tvaru simulovaných křivek s experimentálními daty, obrázek 2 ukazuje tvary křivek FLR, které se za uvedených podmínek standardně měří.



Obrázek č.2.: Experimentálně naměřené křivky FLR na předem adaptovaných listů hrachu a brambor na tmě (20 min) při osvětlení velkou intenzitou excitačního světla ($3400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ červeným světlem (λ okolo 650 nm)). Křivka a) je kontrolní list hrachu, křivka b) je list hrachu inkubovaný při 47°C po dobu 5 min a křivka c) je list bramboru inkubován při 44°C po dobu 13min. Kroky O-K-J-I a P jsou označené a jsou snadno odlišitelné pouze na logaritmické časové ose. (převzato Lazár 1999).

Vzhledem k vlastnostem použitého modelu můžeme křivku FLR simulovat v široké časové škále (tj. od 1 ps do 1 s). Je to proto, že model zahrnuje nejen „pomalé“ přenosy elektronů s časovými konstantami v řádu od desítek mikrosekund na desítky milisekund (jedná se o přechod elektronů z Q_A^- na Q_B , rekombinace elektronů mezi P_{680}^+ a Q_A^- , přechody mezi S-stavy OEC, výměna Q_B^{2-} s PQ molekulou z PQ pool a oxidace/redukce redukováného/oxidovaného PQ poolu), ale i „rychlé“ přenosy

elektronů s časovými konstantami v řádu od stovek pikosekund až stovek nanosekund (tj. nábojová separace, rekombinace a stabilizace, jak jsou definované v RRP modelu a reakce přenosu elektronu mezi Y_Z na P_{680}). Modelovat v široké časové škále můžeme také proto, že fluorescence během simulace FLR je definována jako zářivá deaktivace excitovaných stavů přes rychlostní konstantu fluorescence k_F jejichž hodnota je dostatečně velká. Současné fluorometry však umožňují detekci FLR s časovým rozlišením ne menším než $10 \mu s$, čili FLR se standardně měří od $10 \mu s$. Z toho důvodu také všechny simulace FLR jsou provedeny pro časovou škálu od $10 \mu s$ do 1 s.

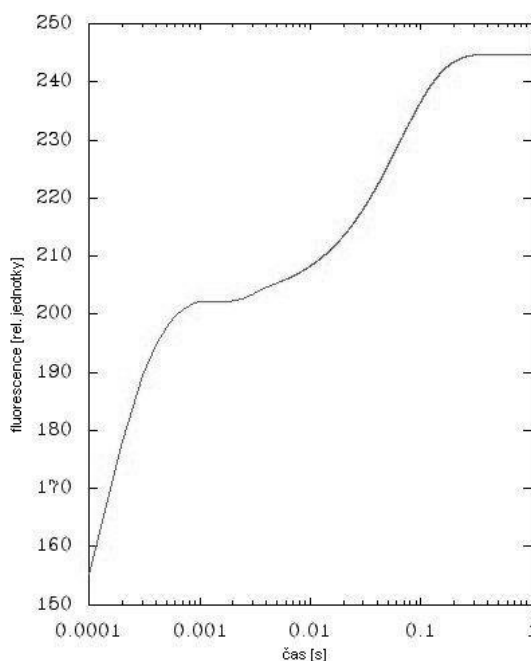


Obrázek 3. Křivka FLR je simulovaná na základě převzatého modelu Lazára 2003, čas má logaritmicky členěnou osu.

Křivka FLR simulovaná na základě původního modelu z publikace Lazár (2003) pro vysokou intenzitu osvětlení za předpokladu, že počáteční formy jsou podle legendy ke schématu 1 a hodnoty rychlostních konstant podle tabulky 1 je zobrazena na obrázku 3.

Z počáteční hodnoty fluorescence (značená jako O), která odráží minimální fluorescenci F_0 , fluorescenční signál stoupá k vlně umístěné okolo 1 – 2 ms, která je totožná s pozicí experimentálně měřené vlny J. Fluorescenční signál pak stoupá a dosahuje svého maxima okolo 50 ms, což přibližně souhlasí s pozicí experimentálně měřené vlny I. Model není schopný nasimulovat experimentálně měřený nárůst fluorescence z vlny I do maxima P. Tato neschopnost modelu byla brána autorem modelu jako argument pro to, že reakce uvažované v modelu jsou nedostačující pro

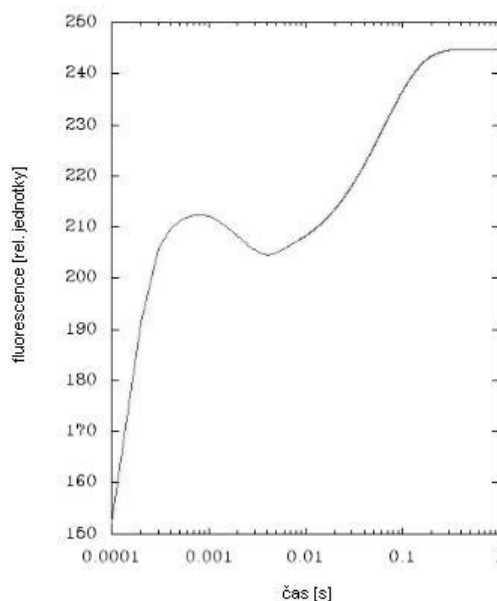
simulaci „správné“ O-J-I-P křivky a je tudíž třeba model rozšířit a vzít v potaz i jiné děje související s přenosem elektronu, například přenos elektronu odehrávající se za PSII nebo zde studovaný vliv lokálních elektrických polí.



Obrázek 4): křivka FLR je simulována na základě modelu, který je rozšířen o elektrické pole vytvářející elektrony přecházející z donoru Y_z na P_{680}^+ a elektrony vyskytující se na akceptorové straně PSII. Časová osa je logaritmičsky členěná.

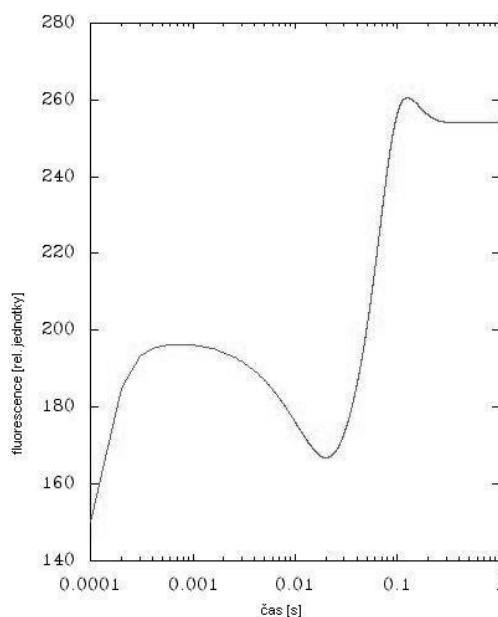
Křivka uvedena na obrázku 4, je simulace křivky FLR, kdy rychlostní konstanty ovlivňuje elektrické pole, které kolem sebe vytvářejí elektrony přenášené mezi přenašeči v PSII. V tomto případě, pro jednoduchost a zjištění, jestli má elektrické pole na průběh křivky vůbec vliv, jsme původní model rozšířili o vliv elektrického pole pouze na akceptorové straně PSII. Ostatní předpoklady jsou stejné jako u křivky zobrazené na obr. 3. Počáteční hodnota fluorescenčního signálu (O) v tomto případě vzrostla. Plató, vytvářející v původní simulaci vlnu J, zaniklo a místo toho se objevilo v simulaci lokální maximum v čase okolo 800 μ s a jeho intenzita je výrazně větší než velikost vlny J v původní simulaci. Vznik lokálního maxima v kratších časech než je vlna J je podobný objevení vlny/píku K ve FLR (viz obr. 2). Pak fluorescenční signál

stoupá až do globálního maxima, které je dosaženo v delších časech a to okolo 500 ms, což odpovídá dosažení maxima P v experimentální křivce FLR.



Obrázek 5 : křivka je simulovaná na základě modelu, který je rozšířen o vliv elektrického pole vytvářející elektrony přenášené z Y_Z na P_{680}^+ a z akceptorové strany. Časová osa je logaritmicky členěná.

Křivka 5 znázorňuje simulaci na základě modelu, který je rozšířen o vliv elektrického pole z části donorové strany PSII, tedy o vliv elektronu, který je darován z Y_Z na P_{680}^+ . Opět počáteční hodnota fluorescenčního signálu (O) vůči kontrole vzrostla. Lokální maximum je umístěné tak jako u křivky na obr. 4 v čase okolo 800 μ s, ale intenzita signálu je vyšší. Po tomto lokálním maximu dochází k poklesu fluorescence do lokálního minima v čase okolo 4 ms a následnému růstu fluorescence do globálního maxima, které je opět dosaženo v časech okolo 500 ms. Celkový tvar takto simulované křivky FLR částečně odpovídá experimentálně měřené křivce FLR na vzorku, který byl před měřením podroben vysokoteplotnímu stresu (viz obr. 2).



Obrázek 6 : křivky FLR je simulovaná na základě modelu, který je rozšířen o elektrické pole jednotlivých S-stavů OEC komplexu, Y_z a akceptorové strany PSII. Časová osa je logaritmičsky členěná.

Poslední modelovaná křivka, zobrazena na obrázku 6, je simulována na základě modelu, který je navíc k předchozímu případě rozšířen i o vliv elektrického pole na přenos elektronu v rámci donace elektronu z jednotlivých S-stavů OEC na Y_z . Počáteční hodnota signálu (O), oproti předchozí křivce, se snížila. Stejně tak i intenzita lokálního maxima umístěného v čase okolo 800 μ s (K). Po lokálním maximu dochází k významnému poklesu do lokálního minima umístěného v čase okolo 2 ms. Po něm dochází k strmému nárůstu signálu do dalšího lokálního maxima okolo 100 ms a následného poklesu. Tvar této simulované křivky FLR se přibližuje tvaru naměřeného experimentálně (viz obr. 2).

7. ZÁVĚR

Úkolem této práce bylo zjistit, zda elektrické pole, které je vytvářeno vznikem aniontů a kationtů přenašečů elektronů v PSII v důsledku fotosyntetického přenosu elektronů, může mít vliv na tvar simulované křivky FLR. Práce vycházela z jednoho z nejpodrobnějších modelů popisujícího reakce přenosu elektronu v PSII. Tento model vytvořil Dušan Lazár a publikoval jej v roce 2003. Obecně platí, že s měnícími se parametry modelu (např. počáteční podmínky nebo hodnoty rychlostních konstant) se mění účinky příslušných reakcí vyskytujících se v PSII a tím se mění i tvar křivky FLR. V této práci jsou v modelu změněné hodnoty dopředných rychlostních konstant. Jejich změna je určována vytvořením elektrického pole, které vytváří jednotlivé elektrony při přenosu z jednoho přenašeče na druhého. Hodnoty dopředných rychlostních konstant se v některých případech v čase zmenšovaly, v jiných zvětšovaly. V simulaci kdy se uvažuje pouze vliv elektrického pole na akceptorové straně PSII, vůči kontrole (neuvažuje vliv žádného elektrického pole) způsobí elektrické pole nárůst vlny J, pokles maxima a jeho posun k delším časům. V další simulaci, kdy elektrické pole ovlivňuje navíc k předchozímu i přenos elektronu z Y_Z na P_{680}^+ způsobí vznik lokálního maxima v kratších časech a poklesu fluorescence za ním. U poslední simulované křivky elektrické pole navíc k předchozímu ovlivňuje i přenos elektronu z S-stavů OEC na Y_Z^+ . V tomto případě dochází k snížení intenzity lokálního maxima a pozvolného, leč „hlubokého“ propadu do lokálního minima. Po něm je pak strmý nárůst signálu do druhého globálního maxima. Tato nasimulovaná křivka nevede přímo ke tvaru křivky, který je experimentálně naměřený, ale ukazuje nám, že vliv elektrického pole na jednotlivých přenašečích elektronů není zanedbatelný, jak se dosud myslelo. Odchytky od experimentálně naměřené kontrolní křivky zapřičiňuje i fakt, že v práci se počítá jen s ovlivněním dopředných rychlostních konstant. Rozdíly mezi experimentálně získanou a teoreticky namodelovanou FLR tedy existují, ale rozšíření modelu o elektrické pole nás zase více posunují, k úspěšnému simulování křivky FLR a zmenšení rozdílů mezi měřenými daty a modelovými křivkami. Musí se ale posoudit ještě další jevy. Model by se měl rozšířit i o vliv elektrického pole i na hodnoty zpětných rychlostních konstant, nebo o vliv elektrického pole napříč tylakoidní membránou (časově proměnné elektrické napětí na tylakoidní membráně). Pokud se nám v budoucnosti podaří přesně modelovat křivky FLR na teoretické bázi, ušetříme mnoho času a prostředků, protože vynaložíme jen část času a nákladů oproti experimentálnímu exaktnímu měření.

8. Seznam literatury

- Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303, 1831-1838
- Lazár D., Nauš J., Matoušková M., Flašarová M. (1997) Mathematical modeling of changes in chlorophyll fluorescence induction caused by herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 57, 200-210
- Lazár D. (1999) Chlorophyll a Fluorescence Induction. *Biochemica et Biophysica Acta* 1412, 1-28
- Lazár D., Pospíšil P. (1999) Mathematical simulation of chlorophyll a fluorescence rise measured with 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated barley leaves at room and high temperatures. *European Biophysics Journal* 28, 468-477
- Lazár D. (2003) Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *Journal of Theoretical Biology* 220, 469-503
- Lazár D. (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology* 33, 9-30
- Zouni A., Witt H.-T., Kern J., Fromme P., Kraub N., Saenger W., Orth P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 749-743
- Lazár D., Schansker G. (2009) Model of chlorophyll a fluorescence Transients. V: Laisk A, Nedbal N: *Photosynthesis in silico*, 85-123, Springer, Dordrecht
- Feynman R.P., Leighton R.B., Sands M. (2001) Feynmanovy přednášky z fyziky s řešenými příklady 2. Fragment, Praha
- Kaplanová M., Nauš J., Vacek K. (1987) *Fyzikální základy fotosyntézy*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, Praha
- Klipp E., Liebermeister W., Wierling C., Kowald A., Lehrach H., Herwig R. (2008) *Systems Biology*. Wiley – VCH Verlag GmbH&CoKGaA, Weinheim
- Lawlor D.W. (2001) *Photosynthesis Third Edition*. Springer, New York
- Vodrážka Z. (2002) *Biochemie*. Akademia, Praha